

DialogWeb

Guided Search new search favorites settings order cost logoff help

Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, Derwent World Patents Index®

Records for: **PN=JP 11155595** save as alert... save strategy only...

Output  Format: **Long** Output as: **Browser** display/send

Modify  refine search back to picklist

select  none

Records 1-2 of 2 In long Format

☐ 1. 1/34/1 (Item 1 from file: 345)

15343492

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 11155595 A2 990615 No. of Patents: 001

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 11155595 A2 990615

DETERMINATION OF LIPOPROTEIN CHOLESTEROL AND REAGENT KIT (English)

Patent Assignee: INT REAGENTS CORP

Author (Inventor): KISHI KOJI; SUMIYAMA ISAO; SHIRAHASE YASUSHI; TOTSU YOSHIFUMI

Priority (No,Kind,Date): JP 97325023 A 971126

Applic (No,Kind,Date): JP 97325023 A 971126

IPC: * C12Q-001/32; C12Q-001/26; C12Q-001/60; G01N-033/92

CA Abstract No: ; 131(05)056137R

Derwent WPI Acc No: ; C 99-398079

Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2005 EPO. All rights reserved.

☐ 2. 1/34/2 (Item 1 from file: 351)

012591973

WPI Acc No: 1999-398079/ 199934

quantitative assay method of lipoprotein cholesterol in biological sample - involves measuring difference in absorbance values of cholesterol in specific lipoprotein fraction by adding cholesterol oxidizing and dehydrogenating enzymes

Patent Assignee: KOKUSAI SHIYAKU KK (KOKU-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11155595	A	19990615	JP 97325023	A	19971126	199934 B

Priority Applications (No Type Date): JP 97325023 A 19971126

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 11155595	A		10	C12Q-001/32	

Abstract (Basic): JP 11155595 A

NOVELTY - The quantitative assay method of lipoprotein cholesterol involves measuring the absorbance value of cholesterol in lipoprotein fractions by addition of cholesterol oxidizing enzyme and dehydrogenase. The difference in measured absorbance value is used to

carry out the quantitative assay. DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for reagent bit used for the quantitative assay of lipoprotein cholesterol.

USE - For quantitative assay of lipoprotein cholesterol in biological sample.

ADVANTAGE - Assay of cholesterol in a specific lipoprotein fraction is done selectively. Operation is simple as centrifugal fractionation is unnecessary. Reduces the measure constant error or an artificial error. Autoanalyzer helps in continuous measurement.

Dwg.0/0

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/32

International Patent Class (Additional): C12Q-001/26; C12Q-001/60;
G01N-033/92

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

select
all none

Records 1-2 of 2 In long Format

Output

Format: Long

Output as: Browser

display / send

Modify

refine search

back to picklist

©1997-2005 Dialog, a Thomson business - Version 2.5

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-155595

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月15日

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/32

C 1 2 Q 1/32

1/26

1/26

1/60

1/60

G 0 1 N 33/92

G 0 1 N 33/92

A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号

特願平9-325023

(22) 出願日

平成9年(1997)11月26日

(71) 出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72) 発明者 岸 浩司

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 角山 功

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 白波瀬 泰史

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(74) 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポ蛋白質コレステロールの定量方法および試薬キット

(57) 【要約】

【解決手段】 他のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定する。その後、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定する。吸光度の差から特定のリポ蛋白質画分中のコレステロール濃度を求める。特に反応液中に濁りを生じない条件下で行う。

【効果】 特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することができる。遠心分離などの分離画分が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、他のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項2】 生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、少なくとも生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にリボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させ、且つ当該反応時に凝集物を生じさせないようにすることを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項3】 リボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物が、カリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマーおよび多糖類から選ばれる少なくとも一種である請求項2記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項4】 生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、生体試料中のリボ蛋白質の凝集を生じさせない条件下で、他のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項5】 特定のリボ蛋白質が、高比重リボ蛋白質、低比重リボ蛋白質、超低比重リボ蛋白質またはレムナント様リボ蛋白質である請求項1～4のいずれかに記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項6】 コレステロール脱水素酵素が、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型、またはThio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型をこれらの還元型に変換する反応を触媒する酵素である請求項1～5のいずれかに記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法。

【請求項7】 特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリボ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要

素とするリボ蛋白質コレステロール測定用試薬キット。

【請求項8】 生体試料中のリボ蛋白質を凝集させずに、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリボ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリボ蛋白質コレステロール測定用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

10 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床診断の分野において、生体試料中のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量する方法、およびこの方法に好適に用いられる試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】古くからリボ蛋白質は、超遠心操作により、高比重リボ蛋白質(HDL, 比重1.063~1.21)、低比重リボ蛋白質(LDL, 比重1.019~1.063)、超低比重リボ蛋白質(VLDL, 比重1.006~1.019)、カイロミクロン(CM, 比重<1.006)に分画されている。この分画操作は、超遠心機を必要とする上に、遠心は数日に亘って行わなければならない、多検体を処理することは出来なかった。これに代わりポリエチレングリコールまたはデキストラン硫酸等のポリアニオンに、マグネシウムやカルシウム等の二価カチオンを共存させたり、リンタングステン酸に二価カチオンを共存させた分画剤なる溶液と血清とを混和させてLDL、VLDL、CMを沈澱させ、遠心後の上清に残るHDLのみを分画する方法が主流となっていた。この方法は、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置を用いることが出来た。即ち、分画したHDL画分中のコレステロールは、酵素法による総コレステロールの測定が自動分析機で確立しているため、それを応用してHDL画分中のコレステロール濃度を求めることが出来た。

【0003】しかしながら、この方法も低速とは言え遠心操作が必要であり、分画剤と血清とを混和させるときの人為的な定量誤差や検体の取り違いなどが問題となっていた。その上、自動分析装置で他の一般的な生化学項目と同時に測定出来なかった。臨床検査は迅速対応が求められており、この事からも検査時間の短縮が課題となっていた。

【0004】一方、臨床的には動脈硬化のリスクファクターであるLDL画分中のコレステロール値を重視する報告〔総コレステロールの基準値と設定根拠、動脈硬化、24(6)、260(1996)〕もある。現在LDL画分中のコレステロール値は総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)及びHDL画分中のコレステロールの測定結果から経験的なファクターを代入して求める。その式〔Friedewald WT, et

al, Clin. Chem., 18, 499-502 (1972))を以下に示す。

【0005】LDL画分中のコレステロール値=(T-CHO値)-(HDL画分中のコレステロール値)-(TG値)/5

【0006】この方法では、測定する3項目が全て正確に測定されなければ成立しない。また、TG値が400mg/dlを越えたり、LDL画分中のコレステロール濃度が100mg/dl以下になると計算値がLDL画分中のコレステロール濃度を反映しなくなると言われている(Warnick GR, et al, Clin. Chem. 36(1), 15-19(1990)、McNamara JR, et al, Clin. Chem. 36(1), 36-42(1990))。従って、肝心な異常値が求められない方法である。他に、電気泳動でリポ蛋白を分離し蛋白量を測定する方法やHPLCによるリポ蛋白別コレステロールの測定方法もあるが、検体処理能力に欠ける方法であり、高価な装置も必要となる。

【0007】近年、HDL画分中のコレステロール測定に関して前述した問題を解決するため、全自動のHDL画分中のコレステロールを測定するキットが開発され普及しつつある。特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報及び特開平8-131195号公報に開示される技術は分画剤を併用するが、分画剤に含まれる二価カチオンとして用いられる金属が自動分析装置で一般的に使用される洗剤により不溶性の沈澱物を形成し、それが廃液機構で蓄積することにより故障の原因となっている。更に反応液中に不溶性の凝集物を形成し、測定結果に影響を与える濁りが生じて測定誤差の原因となっているばかりか、凝集物により反応セルが汚染されて、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与えている。

【0008】普及しているほとんどの自動分析装置は、10分で反応を完了する場合が多い。このとき反応中に濁度変化があつては測定値の正確性に問題がある。その他、反応液が濁ると再現性が低下するという問題も加わる。それ故、測定する検体に制限が加わり、幅広い測定波長と多種多様な患者検体に対応することが出来ない。例えば、340nm付近(UV域)では凝集物による濁りの現象により、吸光度が2~3以上となり分析機の許容範囲をしばしば越えてしまう欠点がある。

【0009】二価カチオンを用いることのない特開平9-96637号公報の技術は、リポ蛋白と凝集する抗血清を含ませる方法であるが、これも難溶性の抗原抗体凝集物を形成するので、反応セルが汚染される。従って、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与える。また、反応液中の濁りが強度となるので、特にUV領域によるHDL画分中のコレステロール測定に対しても前述と同じ原因で正確な測定が不可能

である。高波長域でも濁りの影響で測定値の正確性に欠ける。

【0010】また、このような濁りを最終的に消去する技術である特開平6-242110号公報もあるが、この方法だと最低でも3~4段階の試薬分注操作が必要となり、一般的に普及している生化学項目用の自動分析機は最大二段階のものが主流であるので応用出来ないことが多い。一方、LDL画分中のコレステロールの測定に至っては、現在も計算による方法を採らざるを得ない状況である。

【0011】臨床検査に用いる測定用試薬は、その汎用性を重視するため、緩衝能の維持、安定化、試薬の液状化、防腐効果、短時間測定のため、酵素の活性化等の工夫がなされている。

【0012】コレステロール脱水素酵素(CDH)を用いるコレステロールの測定には反応時間の短縮を目的としたヒドラジン類の添加が必要となる(特開平5-176797号公報)。しかしながらこの方法では、第一反応でヒドラジン類を存在させるので反応液が高イオン強度下となり、さらに第二反応ではCDHの至適pHである8.0付近、すなわちアルカリ性側に反応液を変動させたり、コレステロール脱水素酵素やコレステロールエステラーゼの活性化剤である界面活性剤を添加すると、可溶性複合体とした目的物質以外のものが分解し、その分解物が本反応に関与し、測定値のばらつきの原因となる。

【0013】HDL画分中のコレステロールを測定する条件において、本反応に関与し易い物質としては、LDL画分中の表面に存在する遊離型コレステロールが挙げられる。これらの分解を抑える方法としては、ポリアニオン、二価金属イオン、水溶性高分子化合物または目的物質以外のものに対する抗体を単独あるいは二種以上を組み合わせて添加し、凝集物あるいは免疫複合体を形成させることにより、本反応への関与を抑えることが可能である。

【0014】しかし、これらの凝集物および免疫複合体による濁りの生成は、CDHを用いた波長340nmにおける紫外外部測定方法(UV法)では前述の様々な問題も大きな障害となる。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】このような状況に鑑み、本発明者らは、汎用の自動分析機を用いて遠心操作による分離をせずに、また反応中に濁りを生じさせることなく、生体試料中のHDLやLDLなどのリポ蛋白質の画分中のコレステロールを定量する方法、およびこの方法に好適に用いられる試薬キットについて鋭意研究を行った。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、予め反応液中で測定誤差となる目的以外のリポ蛋白質画分中のコ

10

20

30

40

50

レステロールをコレステロール酸化酵素で反応させて分解させた後、次いで目的とするリボ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素などを用いて測定する方法を見出した。さらに、本発明者らは、生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にカリクスアレン類およびその誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー、多糖類等のリボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させることにより（即ち添加することにより）、反応液中に濁りを生じることなく、リボ蛋白質画分中のコレステロールの各種分別定量が可能であることを見出した。

【0017】すなわち、本発明は、①生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、他のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法、②生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、少なくとも生体試料とコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素との反応時にリボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物を存在させ、且つ当該反応時に凝集物を生じさせないようにすることを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法、③リボ蛋白質コレステロールと水可溶性の複合体を形成し得る化合物が、カリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマーおよび多糖類から選ばれる少なくとも一種である上記②記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法、④生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを他のリボ蛋白質画分の共存下で定量する方法であって、生体試料中のリボ蛋白質の凝集を生じさせない条件下で、他のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール酸化酵素に作用させ、吸光度を測定した後、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを少なくともコレステロール脱水素酵素に作用させ、吸光度を測定し、両吸光度の差から特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを定量することを特徴とするリボ蛋白質コレステロールの定量方法、⑤特定のリボ蛋白質が、高比重リボ蛋白質、低比重リボ蛋白質、超低比重リボ蛋白質またはレムナント様リボ蛋白質である上記①～④のいずれかに記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法、⑥コレステロール脱水素酵素が、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型、またはThio-ニコチン

アミドアデニンジヌクレオチドリノ酸酸化型をこれらの還元型に変換する反応を触媒する酵素である上記①～⑤のいずれかに記載のリボ蛋白質コレステロールの定量方法、⑦特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリボ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリボ蛋白質コレステロール測定用試薬キット、⑧生体試料中のリボ蛋白質を凝集させずに、特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、且つ他のリボ蛋白質画分の共存下で定量するための試薬キットであって、少なくともコレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を構成要素とするリボ蛋白質コレステロール測定用試薬キットである。

【0018】以下、本発明を実施するための諸条件について詳細に説明するが、本発明は以下の記載により何ら制限されるものではない。

【0019】本発明において生体試料とは、血清や血漿などであり、例えば前述のHDL、LDL、VLDL、CMおよびVLDLやCMがリボ蛋白質リパーゼの作用を受けて生じるレムナント様リボ蛋白質等のリボ蛋白質画分を含むものである。リボ蛋白質は、コレステロールを含む脂質成分とアポ蛋白質とが結合することにより内部に脂質、外向きに蛋白質が存在するものであり、生体中で可溶化している。

【0020】本発明においては、目的とする画分以外のリボ蛋白質画分由来のコレステロールを分解する為に、まず当該コレステロールとコレステロール酸化酵素を作用させることを特徴とする（第一反応）。コレステロール酸化酵素としては、コレステロールを酸化することができるものであれば、その由来等には格別の制限はない。第一反応は、pH6.0～8.5、好ましくはpH6.5～7.5の範囲で、25～40℃、好ましくは30～37℃、1～10分、好ましくは3～5分間行う。第一反応終了後、当該反応溶液の吸光度を測定する。吸光度測定の際には、目的とする画分中のコレステロールを測定するために利用する反応ならびに酵素の種類によっても異なるが、例えば下記第二反応時に使用する補酵素として、コレステロール脱水素酵素を用いて、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）の酸化型から還元型への変換を利用する場合は、波長340nm付近での吸光度を測定すればよい。

【0021】生体試料中の特定のリボ蛋白質画分中のコレステロールをコレステロール脱水素酵素に作用させる第二反応は、pH7.0～10.0、好ましくはpH7.5～8.5の範囲で、25～40℃、好ましくは30～37℃、1～10分、好ましくは3～5分間行う。第二反応終了後、第一反応の条件に準じて吸光度を測定

する。

【0022】当該コレステロール脱水素酵素もその由来等については特に制限はなく、コレステロール脱水素反応を触媒するものであればよい。

【0023】第二反応においてコレステロール脱水素酵素を用いる際の補酵素には、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(t-NA D)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ ン酸酸化型(NADP)、Thio-ニコチンアミドアデ ニンジヌクレオチドリ ン酸酸化型(t-NADP)等が 挙げられる。

【0024】第一反応におけるpH6.0~8.5を第 二反応でpH7.5以上、好ましくはpH8.0以上に することで、第一反応に使用したコレステロール酸化酵 素は反応に至適なpH条件から外れる。コレステロール 脱水素酵素はpH8.0以上に至適pHを有する為、第 二反応で効果的に作用する。このpH条件の差により、 目的となる特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールの 定量が可能となるが、コレステロール酸化酵素に対する 特異的な阻害物質であるHLB17以上の非イオン界面 活性剤もしくはイオン性界面活性剤、またはフッ化ナト リウム等を第二反応で添加してもよい。

【0025】本発明においては、生体試料と当該酵素の 反応の際、凝集物が生じ、反応液が濁るのを防ぐ為、 カリクスアレン類およびカリクスアレン誘導体、ポリア ニオン、水溶性ポリマー、多糖類等の化合物が添加され る。これらの化合物は、リポ蛋白質表面とイオン結合ま たは、リポ蛋白質表面の蛋白糖鎖を認識した配位結合に より、複合体を形成するが凝集は起こさない。即ち、こ れらの複合体は、反応溶液中に濁りを生じない可溶性の 複合体である。これらの化合物は主にLDL及びVLD L画分と可溶性複合体を形成し、リポ蛋白質中の成分が 遊離するのを抑制する。

【0026】これらの化合物は、金属イオンをある程度 の濃度添加することにより凝集がおり測定困難となる ので、本発明においては金属イオンを添加しないか、当 該金属イオンの濃度を凝集をおこさせないように設定す る必要がある。金属イオンを添加する場合は約1mMを 超えない程度に抑えるが、通常は金属イオンは添加しな いことが好ましい。

【0027】カリクスアレン類は、フェノールを基本骨 格とし、フェノールの4~8分子をメチレン基で環状に 重合させた環状オリゴマーである。これらのカリクスア レン類に水溶性(親水性)基を導入したカリクスアレン 誘導体も開発されている。カリクスアレン類およびその 誘導体としては、カリクス(4)アレン[Calix (4)arene]、カリクス(6)アレン、カリクス (8)アレン、硫酸カリクス(4)アレン、硫酸カリク ス(6)アレン、硫酸カリクス(8)アレン、酢酸カリ

クス(4)アレン、酢酸カリクス(6)アレン、酢酸カリ クス(8)アレン、カルボキシカリクス(4)アレ ン、カルボキシカリクス(6)アレン、カルボキシカリ クス(8)アレン、カリクス(4)アレンアミン、カリ クス(6)アレンアミン、カリクス(8)アレンアミン などが挙げられるが、使用に際しては特に制限されな い。製品化に成功している硫酸カリクスアレンが水溶性 に優れ取扱いが容易である。カリクスアレン類またはそ の誘導体をコレステロール測定に応用する場合、コレス テロールを酵素的に測定する条件下に、反応液中に0. 05~50mmol/L、好ましくは0.1~10mm ol/Lとなるように添加すればよい。カリクスアレン 類およびその誘導体は、1種または2種以上を用いるこ とができ、2種以上用いる場合の各カリクスアレン類お よびその誘導体の量は上述の範囲内で適宜変更し得る。

【0028】ポリアニオンとしては、デキストラン硫 酸、リンタングステン酸、ヘパリンなどのナトリウム塩 やカリウム塩が挙げられ、反応液中に0.01~1.0 w/v%、好ましくは0.05~0.2w/v%となる ように添加すればよい。

【0029】水溶性ポリマーには、ポリアクリルアミ ド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリエチレン グリコール等が挙げられ、反応液中に0.01~5.0 w/v%、好ましくは0.05~0.2w/v%となる ように添加すればよい。

【0030】多糖類には、レクチン(コンカナバリン A、ヒマメレクチン等)、 λ -カラギーナン、 κ -カ ラギーナン、アルギン酸ナトリウム、Apo-B抗血 清、シクロデキストリン類が挙げられ、反応液中に0. 01~2.0w/v%、好ましくは0.05~0.5w /v%となるように添加すればよい。

【0031】シクロデキストリン(CD)類は、本発明 の目的が達成できるものであればいずれも好適に使用で きるが、とりわけ部分ヒドロキシプロピル化 α -CD、 部分ヒドロキシプロピル化 β -CD、部分メチル化 α - CD、部分メチル化 β -CD、部分ポリマー化 β -CD 等が好ましい。これらCD類は、単独または組み合わせ て用いられる。部分ヒドロキシプロピル化とは、 α また は β -CDを構成する6または7のグルコース残基のう ち少なくとも一のグルコース残基において、2位および /または6位の水酸基の水素原子がヒドロキシプロピル 基〔例えば2-ヒドロキシプロピル基「 $-O-CH_2-CH(OH)-CH_3$ 」〕に置換されていることをいう。また、部分メチル化とは、 α または β -CDを構成する6 または7のグルコース残基のうち少なくとも一のグルコ ース残基において、2位および/または6位の水酸基の 水素原子がメチル基に置換されていることをいう。さら に、部分ポリマー化とは、一の β -CDを構成する7の グルコース残基のうち少なくとも一のグルコース残基に おいて、2位、3位および6位の水酸基のうち少なくと

も一の水酸基が、他の β -CDを構成するグルコース残基の2位、3位および6位の水酸基のうち少なくとも一の水酸基に、架橋剤によって相互に架橋され、複数の β -CD分子がポリマーを形成することをいう。

【0032】LDL画分等と可溶性複合体を形成するこれらの化合物群は、目的に応じて組み合わせて使用するとさらに効果的である。

【0033】次に各画分中のコレステロールの定量について説明する。HDL画分中のコレステロールを定量する場合、第一反応でHDL画分以外のリポ蛋白質画分、特にLDL画分中の遊離型コレステロールが塩濃度やpHの関係で遊離し易くなる。LDLの分解を抑える方法として、可溶性複合体を形成するカリクスアレン類、カリクスアレン誘導体、ポリアニオン、水溶性ポリマー（水溶性高分子化合物）、多糖類の添加が挙げられる。しかしながら、測定対象となる生体試料には多種多様なリポ蛋白質が存在するため、コレステロールの遊離を完全に抑制することは難しい。従って好ましくは、当該遊離型コレステロールをコレステロール酸化酵素による第一反応にて分解させ、第二反応でHDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポアロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール脱水素酵素の反応にて定量する方法が併用される。

【0034】可溶性複合体を形成するために用いられるカリクスアレン類等の化合物の添加量は前述のとおりである。

【0035】LDL画分中のコレステロールを定量する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、即ちpH6.0～8.0程度、イオン強度200～500mmol/L程度の条件下で、第一反応でLDLと可溶性複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL画分およびVLDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポアロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール酸化酵素を作用させる。残ったLDL画分を第二反応にて塩濃度を高めたり界面活性剤を添加したりして分解し、LDL画分中のコレステロールを、必要に応じてリポアロテインリパーゼやコレステロール加水分解酵素の共存下で、コレステロール脱水素酵素の反応にて定量する。第一反応時において、LDLと可溶性複合体を形成する化合物は、その種類の組み合わせと濃度を適宜調整して用いることができる。

【0036】VLDL画分中のコレステロールを定量する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、即ちpH6.5～8.5程度、イオン強度300～600mmol/L程度の条件下で、第一反応でVLDL画分と可溶性複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL画分およびLDL画分中のコレステロールを分解する。第一反応時において、VLDLと可溶性複合体を形成する化合物は、その種類の組み合わせと濃度を適宜調整して用いることができる。第二反応でVLDLの可溶性複合体を分

解させる手段としては、第二反応における酵素反応を妨害しなければ何等制限されず、界面活性剤、コール酸類や酵素を用いるか、塩濃度等を適宜調整すればよい。

【0037】特定のリポ蛋白質画分中のコレステロール濃度は、第一反応および第二反応における吸光度をそれぞれ測定し、その吸光度の差引により求められる。例えば、HDL画分中のコレステロールを定量する場合、HDL画分以外のリポ蛋白質画分のコレステロールを第一反応で分解させた状態での吸光度を測定した後、第二反応での吸光度を測定することにより、第一反応で未反応のHDL画分中のコレステロールを定量することができる。

【0038】当該定量方法は、上述のHDL画分、LDL画分およびVLDL画分のみならず、レムナント様リポ蛋白質画分等の他のリポ蛋白質画分にも応用ができる。

【0039】本発明の定量方法は、本発明の試薬キットによって好適に実施され得る。本発明の試薬キットは、好ましくは第一反応においてコレステロール酸化酵素が少なくとも反応液中に存在するように、第二反応においてコレステロール脱水素酵素が少なくとも反応液中に存在するように配合されたものである。試薬の形態は、乾燥状、液状など特に限定されるものではない。試薬キット中には、酵素の活性化剤などが配合されていてもよく、また試薬キットが、例えば第一反応用試薬と第二反応用試薬との組合せのように、反応液中に添加する時期が異なる複数の種類の試薬を組み合わせたものであってもよい。

【0040】本発明の試薬キットは、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを、コレステロール脱水素酵素で測定するための試薬キットであり、コレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有し、その他の成分として、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量するために用いられる酵素等の試薬を含有するように適宜調整される。例えば、HDL画分やLDL画分中のコレステロールは、総コレステロールを測定する方法により測定される。この際の試薬キットには、コレステロール酸化酵素およびコレステロール脱水素酵素に加えて、リポアロテインリパーゼ、コレステロールエステラーゼ等の酵素、コレステロールを定量する反応を完成させるための条件下で添加する活性化剤、安定化剤、補酵素等が適宜選択され、試薬キット中に配合され得る。本発明のキットに含められるコレステロール脱水素酵素としては前述の如く、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存性コレステロール脱水素酵素、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート依存性コレステロール脱水素酵素等が例示される。

【0041】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するために、HDL画分、LDL画分及びVLDL画分中の各コレス

テロールの定量例について記すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0042】〔実施例1〕 濁度の確認結果

緩衝液に表1に示す化合物を添加し、試薬とした。検体は、超遠心（100,000G）操作で得たVLDL、LDL、HDL画分と正常なヒト血清および乳び検体を用いた。測定は、検体5μlに試薬180μlを加え37℃で5分間インキュベートし、この時点で主波長340nmの吸光度と濁りの確認を行った。対照法として市販されているキット、デタミナーL HDL-C（協和

*学薬品工業（株）社製）、HDL-Cダイレクトワコー（和光純薬（株）社製）の第一試薬を用いた。また、特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報、特開平9-96637号公報の各公報に記載の実施例を参考にした試薬も調製した。操作はキットに添付されている取り扱い説明書及び各公報記載の実施例に従った。結果を表1に示す。本発明において用いられる化合物を添加した試薬では、濁りが生じていないことがわかる。

10 【0043】

メデックス（株）社製）、コレステストHDL（第一化*

【表1】

化 合 物 名 (濃 度)		検 体				
		VLDL	LDL	HDL	血清	乳び血清
硫酸カリクス(4)アレン (1mmol/l)	—	0.000	0.000	—	0.000	—
硫酸カリクス(6)アレン (1mmol/l)	—	0.000	0.000	—	0.005	—
硫酸カリクス(8)アレン (1mmol/l)	—	0.000	0.000	—	0.005	—
デキストラン硫酸ナトリウム (0.1%)	—	0.001	0.003	0.000	0.004	—
リンタンクスチン酸ナトリウム (0.1%)	—	0.027	0.099	0.036	0.000	0.043
ポリアクリル酸 (0.1%)	—	0.000	0.000	0.000	0.000	—
λ-カラギーナン (0.1%)	—	0.000	0.000	0.002	0.009	0.003
Apo-B抗血清 (0.24μg/ml Becker titer)	+	0.051	0.065	0.003	0.076	0.069
コンカナバリンA (0.05%)	—	0.003	0.011	0.001	0.009	0.002
HP-γ-CD (0.1%)	—	0.003	0.000	0.000	0.000	—
DM-β-CD (0.1%)	—	0.013	0.000	0.000	0.008	—
ヘパリンナトリウム (0.1%)	—	0.001	0.000	0.000	0.000	—
アルギン酸ナトリウム (0.1%)	—	0.000	0.000	0.000	0.003	—
PEG200 (0.1%)	—	0.001	0.002	0.000	0.000	—
PEG4000 (0.1%)	—	0.008	0.000	0.000	0.000	—
PEG6000 (0.1%)	—	0.000	0.000	0.000	0.000	—
市販キット	デタミナーL HDL-C	++ 0.106	+++ 1.060	— 0.006	++ 0.186	++ 0.873
	コレステスト HDL	++ 0.241	+++ 1.341	— 0.004	++ 0.565	+++ 2.277
	HDL-Cダイレ クトワコー	++ 0.216	++ 0.487	— 0.013	++ 0.596	+++ 1.496
特許第2600065 号公報		++ 0.161	++ 0.831	— 0.000	+++ 1.913	+++ 3.220
特開平8-201393号公報		— 0.026	++ 0.101	++ 0.099	++ 0.354	+++ 2.093
特開平9-96637 号公報		++ 0.522	+++ 2.604	— 0.045	+++ 1.008	++ 0.874

【0044】注1）各化合物の上段：濁度の強度を示す。下段：340nmにおける検体自身の吸光度を差し引いた複合体形成による吸光度の変化を示す。

【0045】注2）表中の記号は、以下の濁度を示す。
-：濁らない、+：低度の濁り、++：中度の濁り、+※50

※++：高度の濁り、++++：強度の濁り（吸光度2.0以上）

【0046】注3）表中のHP-γ-CDは2-ヒドロキシプロピル-γ-シクロデキストリンを、DM-β-CDはβ-CDを構成するグルコース残基の2位および

6位の水酸基の水素原子がそれぞれメチル基に置換されている γ -シクロデキストリンを示し、PEGはポリエチレングリコールを示す。

【0047】〔実施例2〕 HDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1-A、試薬1-Bおよび試薬2を調製し、HDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、まず検体5 μ lに試薬1-Aまたは試薬1-Bを180 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0048】さらに、試薬2を60 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長*

試薬1-Aの調製

緩衝液	pH6.5
二塩化ヒドラジニウム	80 mmol/L
硫酸カリクス(6)アレン	1.0 mmol/L
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型[NAD]	5.0 mmol/L

【0051】

試薬1-Bの調製

緩衝液	pH6.5
二塩化ヒドラジニウム	80 mmol/L
硫酸カリクス(6)アレン	1.0 mmol/L
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型[NAD]	5.0 mmol/L
コレステロール酸化酵素	10 U/ml

【0052】

試薬2の調製

緩衝液	pH8.5
コレステロール脱水素酵素	20 U/ml
コレステロール加水分解酵素	6 U/ml

【0053】

【表2】

単位: mg/dl

検体	対 照 法	試薬1-A	試薬1-B
1	46.7	54.1	47.3
2	33.1	40.7	32.2
3	52.4	62.3	56.0
4	27.0	41.1	32.5
5	40.0	49.2	42.7
6	31.4	38.9	32.1
7	70.4	76.4	70.0
8	84.5	93.2	84.2
9	29.5	43.4	36.6
10	57.5	63.3	58.8

【0054】〔実施例3〕 LDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1および試薬2を調製し、LDL-コレステロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施し※50

*570nmで吸光度2を測定した。

【0049】吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のHDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法としてポリエチレングリコール(PG)法を用いた。PG法は国際試薬(株)製PGボールを使用した。また、遠心後の上清のコレステロール濃度は、国際試薬(株)製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表2に示した。コレステロール酸化酵素が添加されていない試薬1-Aでは、対照法に比べて高値を示すが、コレステロール酸化酵素が添加された試薬1-Bでは、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0050】

※た。操作法は、まず検体3 μ lに試薬1を210 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0055】さらに、試薬2を70 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度2を測定した。

40 【0056】吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のLDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法では、フリーデワルド式によりLDL-コレステロール濃度を求めた。HDLコレステロール値は、国際試薬(株)製PGボールを使用した。総コレステロール値は、国際試薬(株)製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。TG値は、国際試薬(株)製TG試薬・Aを用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表3に示した。本法は、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0057】

15

16

試薬1の調製

緩衝液	pH7.0
硫酸カリクス(6)アレン	1.0 mmol/L
コレステロール脱水素酵素	20 U/ml
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 [NAD]	5.0 mmol/L
コレステロール酸化酵素	10 U/ml
コレステロール加水分解酵素	1 U/ml

【0058】

試薬2の調製

緩衝液	pH8.5
二塩化ヒドラジニウム	300 mmol/L
コレステロール加水分解酵素	3 U/ml

【0059】

【表3】

単位: mg/dl

検体	対照法	本 法
1	118	116
2	178	177
3	58	45
4	137	145
5	113	117
6	80	80
7	102	104
8	93	94
9	192	194
10	120	128

* テロール濃度を測定した。検体は、一般人の血清5例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体5 μ lに試薬1を180 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度1を測定した。

【0061】さらに、試薬2を60 μ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340nmおよび副波長570nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を求めて、既知のVLDL-コレステロール濃度の血清を標準液として検体の値を換算した。対照法として超遠心法を用いた。測定結果として対照法との比較を表4に示した。本法は、対照法の結果とよく一致した良好な結果となった。

【0062】

【0060】〔実施例4〕 VLDL画分中のコレステロールの定量

以下の試薬1および試薬2を調製し、VLDL-コレス*

試薬1の調製

緩衝液	pH8.0
コレステロール脱水素酵素	20 U/ml
β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 [NAD]	5.0 mmol/L
塩化ナトリウム	100 mmol/L
コール酸ナトリウム	0.1 %
コレステロール酸化酵素	10 U/ml
コレステロール加水分解酵素	1 U/ml

【0063】

試薬2の調製

緩衝液	pH8.5
二塩化ヒドラジニウム	300 mmol/L
トリトンX-100	0.4 %
コレステロール加水分解酵素	3 U/ml

【0064】

【表4】

※

※

単位: mg/dl

検体	対照法	本 法
1	15.2	13.2
2	13.6	11.2
3	26.2	24.5
4	41.0	45.6
5	22.2	18.5

50 【0065】

17

【発明の効果】本発明によれば、第一反応でコレステロール酸化酵素と反応させ、第二反応でコレステロール脱水素酵素と反応させることにより、目的とするリポ蛋白質画分以外の画分由来のコレステロールの影響を排除することが可能となる。

【0066】さらに本発明によれば、生体試料中のリポ蛋白質を凝集させることなく、特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することができる。すなわち、測定用試薬に、カリクスアレン類やその誘導体、ポリアニオン、多糖類（シクロデキストリン類など）、水溶性ポリマー等を反応液中に含ませることにより、生体試料中のリポ蛋白質を凝集させることなく、且つ他のリポ蛋

18

白質の影響を受けることなく、選択的に特定のリポ蛋白質画分中のコレステロールを定量することが可能となる。

【0067】以上のことより、本発明の方法ならびに本発明の試薬キットを用いる方法では、遠心分画などの分離分画が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。

【0068】また、二種類の試薬を用いる方法に応用できるので、汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

10

フロントページの続き

(72)発明者 渡津 吉史

神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内